(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift

(11) DE 3724443 A1

(51) Int. Cl. 4:
C12Q 1/56
G01N 33/50

(21) Aktenzeichen: P 37 24 443.4
(22) Anmeldetag: 23. 7. 87
(43) Offenlegungstag: 2. 2. 89

DE 3724443 A1

(71) Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

(74) Vertreter:

Weickmann, H., Dipl.-Ing.; Fincke, K., Dipl.-Phys. Dr.; Weickmann, F., Dipl.-Ing.; Huber, B., Dipl.-Chem.; Liska, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Prechtel, J., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

(72) Erfinder:

Erfinder wird später genannt werden

(54) Funktioneller Test zur Bestimmung der Protein S-Aktivität

Zur Bestimmung der Protein S-Aktivität im Plasma wird ein Faktor V und Phospholipid enthaltendes Substratplasma, welches auf eine bestimmte Menge an aktiviertem Protein C eingestellt ist, mit dem zu testenden Plasma, welches in einer Verdünnung von mindestens 1 : 2 eingesetzt wird, inkubiert, dann bestimmte Mengen an Prothrombin und Faktor Xa zugesetzt und danach die Gerinnungszeit als Maß für din Protein S-Aktivität bestimmt.

DE 3724443 A1

BUNDESDRUCKEREI 12.88 808 865/273 8/70

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Protein S-Aktivität im Plasma, **dadurch gekennzeichnet**, daß man ein Faktor V und Phospholipid enthaltenes Substratplasma, welches auf eine bestimmte Menge an aktiviertem Protein C, eingestellt ist, mit dem zu testenden Plasma, welches in einer Verdünnung von mindestens 1:2 eingesetzt wird, inkubiert, dann bestimmte Mengen an Prothrombin und Faktor Xa zusetzt und danach die Gerinnungszeit als Maß für die Protein S-Aktivität bestimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Substratplasma verwendet, welches keine Vitamin K-abhängigen Proteine enthält und diesem Plasma bestimmte Mengen an gereinigtem aktiviertem Protein C.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Substratplasma, welches keine Vitamin K-abhängigen Proteine enthält, ein mit $Al(OH)_3$ behandeltes humanes Plasma verwendet.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man dem Substratplasma Kalziumionen und Phospholipid zusetzt.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Konzentration an aktiviertem Protein C im Test auf 0,5 bis 5 µM/ml einstellt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Konzentration von aktiviertem Protein C im Test von 1 bis 2 µM/ml einstellt.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß man 1 bis 5 µM Prothrombin, 4 bis 8 nM Faktor Xa, 150 bis 300 mM CaCl je 1 ml Testlösung einsetzt.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur funktionellen Bestimmung von Protein S in Körperflüssigkeiten, insbesondere im Plasma, und ein hierfür geeignetes Reagens.

Protein S zählt zu den körpereigenen Inhibitoren und wirkt als Kofaktor bei dem proteolytischen Abbau der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa durch aktiviertes Protein C (Walker, F.J. (1980) J.Biol.Chem. 255, 5521 – 5524; Walker, F.J. et al. (1987) Arch.Biochem. Biophys. 252, 322 – 328). Demnach kommt dem Protein S eine große Bedeutung im Protein C/Thrombomodulin-Inhibitorsystem zu.

Es ist bekannt, daß Protein S in der Leber und in den Endothelzellen Vitamin K-abhängig synthetisiert wird (Stern, D. et al. (1986) J.Cell Biol. 102, 1971 – 1978). Demnach ist bei der Therapie mit Vitamin K-Antagonisten die Protein S-Konzentration im Blut erniedrigt.

Es ist ferner bekannt, daß bei Patienten mit thrombembolischen Erkrankungen oder disseminierter intravasaler Gerinnung eine Erniedrigung der Protein S-Aktivität auftreten kann. Ein angeborener Protein S-Mangel stellt einen Risikofaktor zur Entstehung von thrombembolischen Erkrankungen dar (Comp, P.C. et al. (1984) J. Clin.Invest. 74, 2082 – 2088; Bertina, R.M. (1985) Haemostasis 15, 241 – 248).

Daher besteht ein Bedarf an einer Methode zur Bestimmung der Protein S-Aktivität.

Darüber hinaus könnte der Bestimmung der Protein S-Aktivität eine besonder Bedeutung zukommen, da dieses Protein im Plasma nur zu 40% in freier Form auftritt, während etwa 60% des Protein S mit dem "C4b-binding protein" komplexiert ist (Dahlbäck, B. (1983) Biochem.J. 209, 847 – 856). Protein S, das an C4b-binding protein gebunden ist, ist jedoch als Kofaktor für aktiviertes Protein C inaktiv (Dahlbäck, B./1986) J.Biol.Chem. 261, 12022 – 12027).

Bekannt ist nur, das Protein S als Antigen unter Verwendung von Antikörpern zuverlässig zu bestimmen. Über die Protein S-Aktivität sagt diese Methode jedoch nichts aus. Die funktionelle Protein S-Aktivität im Plasma läßt sich bisher nicht zuverlässig erfassen. Zwar wird ein funktioneller Test zur Bestimmung der Protein S-Aktivität, bei dem die Verlängerung der Gerinnungszeit im Einstufen Faktor Xa-Test durch aktiviertes Protein C gemessen wird, beschrieben in Comp, P.C. et al. (1984) J.Clin.Invest. 74, 2082 – 2088; Comp, P.C. et al. (1986) Blood 86, 881 – 885). Dieser Test hat sich jedoch nicht bewährt, da er unspezifisch ist und durch Konzentrationsänderungen verschiedener anderer Gerinnungsfaktoren beeinflußt wird.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und ein Reagens zu entwickeln, um die Protein S-Aktivität im Plasma zuverlässig und spezifisch zu bestimmen.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren, welches auf der Erkenntnis beruht, daß in einem Einstufen-Test unter Verwendung isolierter Gerinnungskomponenten die Gerinnungszeit von dem Protein C/Protein S-Inhibitorsystem abhängt. Bei konstanter Menge an zugesetztem aktiviertem Protein C ist die Verlängerung der Gerinnungszeit ausschließlich von der Protein S-Aktivität abhängig. Erfindungsgemäß wird daher die Bestimmung durch Messung der Gerinnungszeit im Plasma einstufig unter Einsatz konstanter Mengen an Prothrombin, aktiviertem Protein C, Faktor V und Phospholipiden durchgeführt.

Das Verfahren der Erfindung ist dadurch gekennzeichnet, daß man ein Faktor V und Phospholipid enthaltendes Substratplasma, welches auf eine bestimmte Menge an aktiviertem Protein C, eingestellt ist, mit dem zu testenden Plasma, welches in einer Verdünnung von mindestens 1:2 eingesetzt wird, inkubiert, dann bestimmte Mengen an Prothrombin und Faktor Xa zusetzt und danach die Gerinnungszeit als Maß für die Protein S-Aktivität bestimmt.

Es wurde gefunden, daß der Test die im Plasma vorliegende Protein S-Aktivität spezifisch und sensitiv mißt. Dabei beeinflußt überraschenderweise die Konzentration an Fibrinogen, Prothrombin, Protein C und aller weiterer Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren außer der zu bestimmenden Protein S-Aktivität in dem für die Untersuchung eingesetzten Plasma den Test nicht. Auch reagiert der Test nicht auf Konzentrationsveränderungen der Faktoren V und VIII.

Die für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens notwendigen Substanzen, welche die für die

Durchführung der Erfindung geeigneten Eigenschaften aufweisen, können nach bekannten Verfahren erhalten werden. So wird ein geeignetes Substratplasma, welches bestimmte Mengen an aktiviertem Protein C enthält, erhalten, indem man entweder aus einem Plasma zuerst die Vitamin K-abhängigen Proteine entfernt und dann in vorgegebener bestimmter Menge, vorzugsweise in Form von gereinigten Substanzen wieder zusetzt, oder indem man von einem aus gereinigten Substanzen zusammengesetzten Substratplasma von vornherein ausgeht, also ein synthetisches Plasma verwendet. Vorzugsweise wird ein Substratplasma verwendet, aus dem die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren durch Adsorption an einem geeigneten Adsorptionsmittel wie z. B. $AlOH_3$ entfernt werden und das dann mit bestimmten Mengen an gereinigten Faktoren wieder aufgestockt wird.

Diese Faktoren selbst lassen sich nach bekannten Verfahren in der gewünschten Reinheit gewinnen. So kann aktiviertes Protein C beispielsweise nach dem in Bio. Chem. 26 (1987) 2521 – 2528 beschriebenen Verfahren in der für die Erfindung geeigneten Qualität hergestellt werden. Die Konzentration von aktiviertem Protein C (APC) im Test liegt zweckmäßig zwischen 0,5 und 5 µM/ml, vorzugsweise 1 bis 2 µM/ml.

Als Phospholipid wird vorzugsweise Cephalin verwendet, welches natürlichen Ursprungs oder synthetisch hergestellt sein kann. Prothrombin und Faktor Xa sind in geeigneten Reinheitsgraden handelsüblich, können aber auch selbst aus Plasma nach bekannten Isolierungsmethoden hergestellt werden. Vorzugsweise setzt man dem Substratplasma außerdem Kalziumionen, beispielsweise in Form von $CaCl_2$ zu. Die Konzentration an a) Prothrombin, b) Faktor Xa und c) CaCl beträgt vorzugsweise a) 1 bis 5 µM, b) 4 bis 8 nM und c) 150 bis 300 mM je ml im Test, falls APC im oben angegebenen Bereich liegt.

Die Durchführung des Verfahrens der Erfindung erfolgt zweckmäßigerweise durch Mischen von Substratplasma, Phospholipiden, Kalzium, des zu testenden Plasmas und von aktiviertem Protein C. Nach einer definierten Inkubationszeit, die z. B. zwischen 20 Sekunden und 2 Minuten liegen kann, werden gereinigtes Prothrombin und aktivierter Faktor Xa in bestimmter Menge zugefügt. Durch Zugabe des Faktors Xa wird gestartet und danach die Gerinnungszeit gemessen. Zweckmäßigerweise wird für die Auswertung eine Kalibrierungskurve unter Verwendung verschiedener Verdünnungen eines normalen gepoolten Plasmas, z. B. in Verdünnungsschritten von 1 : 64, 1 : 32, 1 : 16 und 1 : 8, hergestellt. Der Test wird jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von aktiviertem Protein C durchgeführt.

Das Verfahren kann beispielsweise wie folgt durchgeführt werden:

100 µl Substratplasma ($Al(OH)_3$-adsorbiertes humanes Plasma)
25 µl Cephalin (Phospholipide)
25 µl $CaCl_2$ (75 mM)
50 µl zu testendes Plasma (1:8 verdünnt)
35 µl humanes aktiviertes Protein C (0,5 µM)

werden gemischt und 1 Minute bei 37 °C inkubiert. Dann werden 50 µl humanes Prothrombin (1 µM) zugesetzt und erneut 0,5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich wird durch Zusatz von 50 µl boviner Faktor Xa (2 nM) gestartet und die Gerinnungszeit in üblicher Weise bestimmt.

Das Testergebnis ist spezifisch für die Anwesenheit von Protein S-Aktivität im Plasma. Insbesondere ist das Verfahrensergebnis unabhängig von Schwankungen in der Menge der Gerinnungsfaktoren X, V, Fibrinogen und Prothrombin im zu testenden Plasma. Die Spezifität des Tests ergibt sich aus der nachstehenden Tabelle 1.

Tabelle 1

Spezifität des funktionellen Tests zur Bestimmung der Protein S(PrS)-Aktivität

Behandlung des zu testenden Plasmas	Gerinnungszeit (s)		Differenz (s)
	– APC	+ APC	
–	42,5	62,6	20,1
Anti-(PrS)-IgG	46,7	46,2	– 0,5
Kaninchen-IgG	43,8	62,8	19,0
$BaSO_4$-Adsorption + PrS zugefügt	46,9	64,7	17,8

– APC: ohne aktiviertes Protein C
+ APC: mit aktiviertem Protein C

Zwischen der funktionellen Protein S-Aktivität und der Verlängerung der Gerinnungszeit besteht eine lineare Korrelation, wie die graphische Darstellung von Fig. 1 zeigt. In dieser ist die Gerinnungszeit gegen die eingesetzte Plasmamenge aufgetragen. Mit dem Test der Erfindung sind auch extrem niedrige Protein S-Aktivitäten bei veränderter Verdünnung des zu testenden Plasmas zu messen. Die Reproduzierbarkeit des Tests, sowohl in der Serie als auch von Tag zu Tag, zeigt Tabelle 2:

Tabelle 2

Inter-Assay und Intra-Assay Variationen des funktionellen Protein S (PrS)-Test bei *n* Experimenten, die mit Plasmaproben durchgeführt wurden, die unterschiedliche PrS-Konzentrationen enthielten

PrS-Aktivität (%)	*n*	Inter-Assay Variationskoeff. (%)	Intra-Assay Variationskoeff. (%)
96	20	11,7	10,1
50	14	14,7	n.d
21	20	32,1	32,2

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich daher zur Überprüfung der Protein S-Aktivität bei gesunden Personen und bei Patienten unter Therapie mit Vitamin K-Antagonisten (oralen Antikoagulantien). Fig. 2 zeigt die Abhängigkeit der Protein S-Aktivität von der Intensität der Behandlung mit oralen Antikoagulantien.

Aus der Tabelle 3 geht die Bedeutung der Bestimmung der Protein S-Aktivität hervor, da sie zeigt, daß das Protein S-Antigen nicht mit der Intensität der Therapie mit oralen Antikoagulantien korreliert, jedoch mit der Protein S-Aktivität.

Tabelle 3

Analyse des Protein S (PrS)-Antigen, der PrS-Aktivität und der Protein C (PC)-Aktivität bei Patienten unter oralen Antikoagulantien. Die Intensität der Therapie ist als "International Normalized Ratio" (INR) angegeben. Angeführt sind Mittelwerte +/− Standardabweichung.

INR	*n*	PrS-Aktivität (%)	PrS-Antigen (%)	PC-Aktivität (%)
Alle Patienten				
1,6 – 7,8	31	21,1 ± 10,8	69,9 ± 21,2	10,9 ± 6,4
Untergruppen				
< 2,7	12	29,0 ± 10,0	86,3 ± 12,3	15,9 ± 7,8
2,7 – 4,7	12	20,9 ± 6,7	65,4 ± 16,4	9,0 ± 2,1
> 4,7	7	9,5 ± 5,5	52,1 ± 21,6	6,3 ± 0,9

Bei Patienten mit thrombembolischen Erkrankungen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, eine Bestimmung der Protein S-Aktivität durchzuführen, da auf diese Weise neue Risikofaktoren für die Entstehung von thrombembolischen Erkrankungen entdeckt wurden. Mit dem funktionellen Test zur Bestimmung der Protein S-Aktivität gemäß der Erfindung ist es damit möglich geworden, Patienten mit falsch synthetisiertem Protein S zu diagnostizieren (Tabelle 4).

Tabelle 4

Analyse des Protein S (PrS) bei Patienten mit angeborenem Protein S-Mangel

Patient	PrS-Aktivität (% normal)	PrS-Antigen (% normal)
1	15	74
2	62	73
3	34	60
4	13	55
5	20	95

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung weiter:

Beispiel

Verwendete Substanzen: Prothrombin, Protein C (PC), sowie Protein S (PrS) wurden aus der Bariumeluatfraktion von Humanplasma durch Chromatographie über DEAE A-50 (Diethylaminogruppen tragende Agarose der Fa. Pharmacia) isoliert. Der Prothrombin-Pool wurde weiter nach dem in Methods.Enzymol. 80, 221 – 228 (1981)

beschriebenen Verfahren von Miletich mit sulfatiertem Sephadex G-50 behandelt. PC und PrS wurden aus dem gleichen Pool durch zwei aufeinanderfolgende Passagen über Sephacryl S-200 (Biochemistry 26, 2521 – 2528 (1987) in 20 mM Tris-HCl, pH 8,1 enthaltend 1 M NaCl, 5 mM EDTA und 2 mM Benzamidinhydrochlorid, gefolgt von Trennung über Heparinsepharose (Thromb. Haemostas. 48, 1 – 5 (1982)) gereinigt. Die erhaltenen Proteine waren in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung des Puffersystems von Lämmli (Nature, 227, 680 – 685 (1970)) homogen und das gereinigte PrS enthielt kein C4b-bindendes Protein. Antikörper gegen PrS wurden in Kaninchen gebildet und die IgG-Fraktion wurde nach Standardmethoden im Anschluß an die Adsorption des Antiserums an mit 1/20 Volumen $Al(OH)_3$ adsorbiertem Humanplasma hergestellt. Aktiviertes PC (APC) wurde durch Inkubation mit gereinigtem Humanthrombin für 1 Stunde bei 37°C und bei einem Thrombin/PC-Molverhältnis von 1:30 hergestellt und anschließend über SP-Sephadex C-50 gereinigt. Rinderfaktor Xa wurde von der Firma Diagnostic Reagents Ltd. (Thame, GB), Kaninchenhirncephalin von Sigma (München, BRD) erhalten und vor Verwendung 1:10 verdünnt.

100 µl Substratplasma wurden mit 25 µl Cephalin, 25 mM $CaCl_2$, 50 µl einer 1:8 Verdünnung des zu untersuchenden Probeplasmas (hergestellt mit Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung enthaltend 0,38% Trinatriumcitrat) und 35 µl Human-APC (0,05 µM Endkonzentration) oder Puffer (Kontrolle) in dieser Reihenfolge gemischt und in einer rotierenden Küvette 1 Minute bei 37°C vorinkubiert. Dann wurden 50 µl gereinigtes Humanprothrombin (0,15 µM Endkonzentration) zugesetzt und die Inkubation 30 Sekunden bei 37°C fortgesetzt. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von 50 µl Rinderfaktor Xa (Endkonzentration 0,3 nM) gestartet und die Gerinnungszeit jeweils doppelt bestimmt auf einem automatischen Koagulationsmeßgerät (KC10, Amelung, Lemgo, BRD).

Eine Kalibrierungskurve wurde mit 25%, 50%, 75% und 100% PrS-Aktivität (entsprechend einer Verdünnung von normalgepooltem Plasma von 1 : 64, 1 : 32, 1 : 16, 1 : 10,7 und 1 : 8) in Abwesenheit und in Gegenwart von APC täglich hergestellt, und die Verlängerung der Gerinnungszeit wurde gegen die prozentuale PrS-Aktivität aufgetragen. Die Spezifität des Tests für PrS wurde bewiesen durch Verwendung von PrS-freier Probeplasma, welches durch Entfernung von PrS unter Verwendung von Anti-PrS-Antikörpern hergestellt worden war und durch Rekonstitution solches PrS-freien Probeplasmas mit gereinigtem PrS. Als Gegenkontrolle wurde ein Probeplasma verwendet, welches mit irrelevantem Kaninchen-IgG versetzt worden war.

3724443

37 24 443
C 12 Q 1/56
Anmeldetag: 23. Juli 1987
Offenlegungstag: 2. Februar 1989

Figur 1

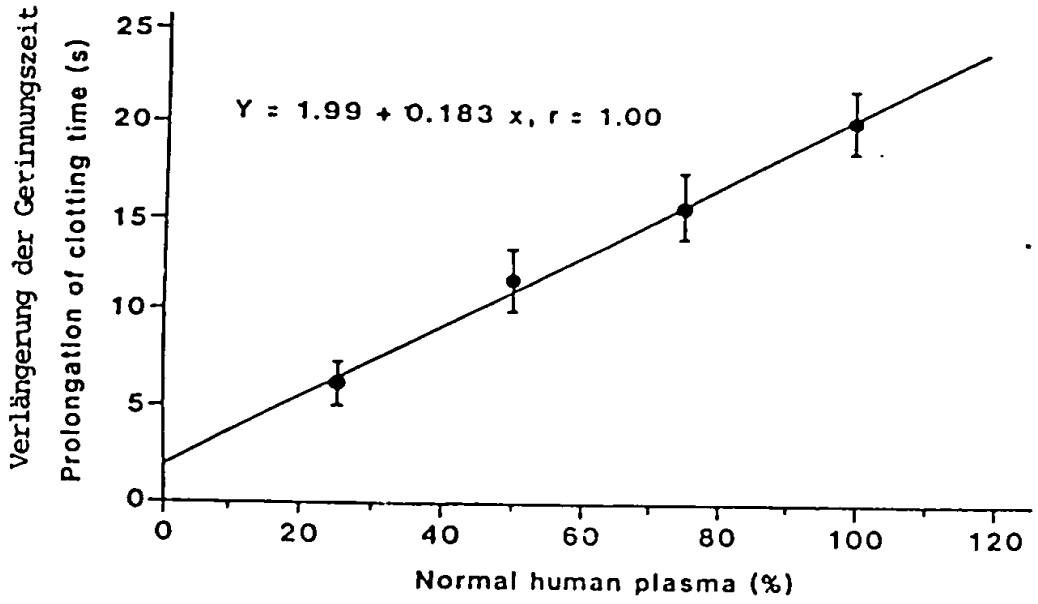


Abbildung 1: Eichkurve zur funktionellen Bestimmung der Protein S-Aktivität.

Figur 2

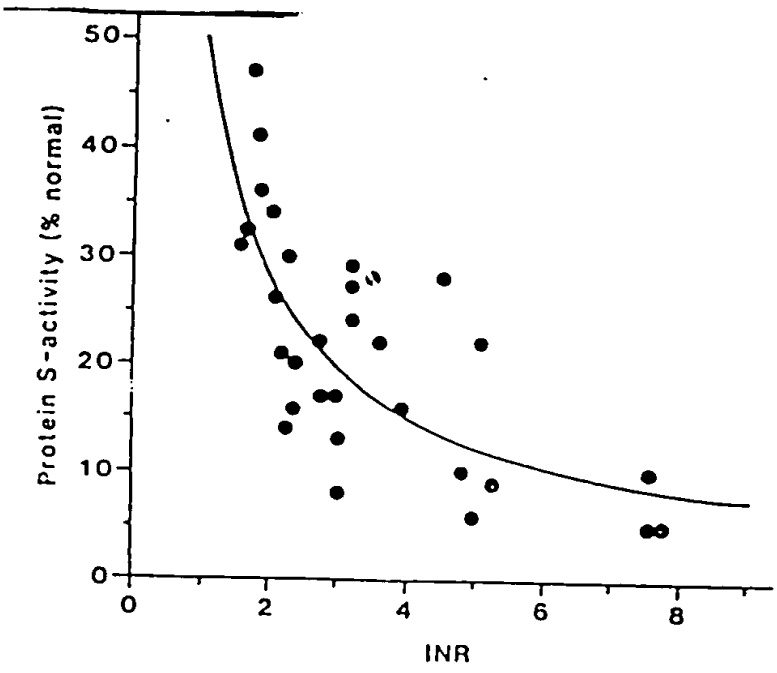


Abbildung 2: Abhängigkeit der Protein S-Aktivität von der Intensität einer Therapie mit oralen Antikoagulantien gedrückt als International Normalized Ratio (INR).